

# CITED Reference

(10) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-523729

(P2001-523729A)

(40) 公表日 平成13年11月27日 (2001.11.27)

(51) Int.Cl.

A 6 1 K 39/39  
A 6 1 P 31/16  
C 0 7 K 14/11  
14/245

識別記号

F I

A 6 1 K 39/39  
A 6 1 P 31/16  
C 0 7 K 14/11  
14/245

コード(参考)

4 C 0 8 5  
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2000-521855(P2000-521855)  
 (22) 出願日 平成10年11月24日(1998.11.24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年5月17日(2000.5.17)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP98/07553  
 (87) 國際公開番号 WO99/26654  
 (87) 國際公開日 平成11年6月3日(1999.6.3)  
 (31) 優先権主張番号 97203671.9  
 (32) 優先日 平成9年11月25日(1997.11.25)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁(E P)

(71) 出願人 デュファー・インターナショナル・リサーチ・ペー・ブイ  
 DUPHAR INTERNATIONA  
L RESEARCH BESLOTEN  
VENNOOTSHAP  
オランダ・1380ディエイ ウエースプ・シ  
ージエイパンホウテンラーン36  
 (71) 出願人 ウニペルシタイト・バン・グロニンゲン  
 オランダ・エヌエル-9712シービー グロ  
ニンゲン・ブルーストラート5  
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LTBアジュバントを含むワクチン

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも一つの粒子状免疫原および大腸菌(E, c o l i)に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニットのアジュバント作用性量を含むワクチンに関する。さらに具体的には本発明は、アジュバント用LTBにAサブユニットもしくはホロトキシンが混入していないワクチンに関する。この目的のために好ましくは組換えDNA技術により調整されたLTBの使用が実施される。粒子状免疫原は例えばウイルス、細菌、もしくは真菌類に関連することができるか、もしくはそういったものから得ることができる。このワクチンは、粘膜(例えば、鼻腔内)投与による前記粒子状免疫原に対する防御応答の誘導に特に適する。こういった投与により、粒子状免疫原に関連する病原体に対する全身性防御および粘膜防御の両方がもたらされることが見いだされた。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 少なくとも一つの粒子状免疫原および大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット（LTB）のアジュバント作用性量を含むワクチン。

【請求項2】 LTBにAサブユニットもしくはホロトキシンが混入していない、請求の範囲1に記載のワクチン。

【請求項3】 LTBが組換えDNA法により調製される、請求項1～2に記載のワクチン。

【請求項4】 ウィルスもしくは細菌もしくは真菌類の抗原が免疫原として用いられる、請求項1～3に記載のワクチン。

【請求項5】 免疫原が、粘膜感染により伝播する疾患に対する免疫感作を提供する、請求項1～3に記載のワクチン。

【請求項6】 インフルエンザ抗原が免疫原として用いられる、請求項5に記載のワクチン。

【請求項7】 ある免疫原に対する全身性免疫グロブリン応答の誘導方法であって、粒子形態をとる前記免疫原および大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニットのアジュバント作用性量を粘膜投与する方法。

【請求項8】 ある免疫原に対する一般的粘膜免疫応答の誘導方法であって、粒子形態をとる前記免疫原および大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニットのアジュバント作用性量を粘膜投与する方法。

【請求項9】 大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシン（LTB）のBサブユニットの、粒子状免疫原、および粘膜投与の際の個体内での前記免疫原に対する全身性免疫グロブリン応答の誘導に適する前記LTBのアジュバント作用性量を含むワクチン調製物での使用。

【請求項10】 大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット（LTB）の、粒子状免疫原、および局所粘膜投与の際の個体内での前記免疫原に対する一般的粘膜免疫応答の誘導に適する前記LTBのアジュバント作用性量を含むワクチン調製物での使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【技術分野】**

本発明は、粘膜免疫アジュバント (mucosal immuno adjuvant) としての大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) (E. c o l i) の易熱性 (heat-labile) エンテロトキシンのBサブユニット (LTB) を含むワクチンに関する。本発明は特に、ヒトにおけるインフルエンザ感染を予防するためのこの種のワクチンに関する。しかしながら本発明はインフルエンザワクチンにおける適用には制約されない。

**【0002】**

特定の病原体に由来する抗原製剤の導入を通して感染性作用物質に対する免疫応答を刺激することにより予防接種した被検体の感染を予防もしくは少なくとも抑制することが、感染症に対する予防接種の目的である。理想的には、誘導された免疫応答は2つの構成成分、すなわち液性応答（抗原特異的抗体の産生）および細胞性応答（その病原体による感染を受けた細胞を除去することができる特異的細胞障害性Tリンパ球の産生）からなるはずである。

**【0003】**

多くの予防接種法は、不活化もしくは弱毒化させた全病原体を含む製剤の投与を必要とする。しかしながら一定の病原体については全病原体を用いる予防接種にはかなりの欠点があり、なぜならそういった調製物は例え通常は高い免疫原性を示すとしても、望ましくない、副作用を有することがあるためである。このことにより、全感染性作用物質の不利な副作用を実質的には欠く非常に厳密に限定されたサブユニットワクチンもしくは合成ワクチンの使用が最近の傾向になっていることが説明される。しかしながら全病原体と比較すると、サブユニットワクチンもしくは合成ワクチンは、少なくとも添加アジュバントがない状態ではあまり免疫原性がでないことがよくある。

**【0004】**

アジュバントは、抗原と組み合わせて投与され、そうすることでその抗原に対する免疫応答を刺激化するための物質もしくは材料である。望ましくない副作用

を生じることなくサブユニット抗原もしくは合成抗原に対する免疫応答を強化する適切なアジュバントについての必要性が存在する。

#### 【0005】

インフルエンザワクチン製剤は不活化もしくは弱毒化された全ウイルスを長いこと含んできたり、幾つかの事例では未だに含んでもいる。こういった製剤はかなりの副作用をもつことがあり、最も悪名の高いものは発熱および注入部位での応答である。今日では、通常、予防接種はサブユニット製剤を用いて行われる。このサブユニットワクチンでは生じる副作用応答が少なく、そしてウイルスの2つの主要表面抗原、すなわち赤血球凝集素（H A）およびノイラミニダーゼ（N A）のみを、幾分かは精製された形態で含む。最も最近のワクチン製剤では添加アジュバンドは一切存在しない。

#### 【0006】

不活化もしくは弱毒化された全インフルエンザウイルスワクチンならびにサブユニットワクチンは通常は一回の筋肉内（i. m.）注射を通して投与される。いずれの予防接種法により達成されるインフルエンザ感染に対する予防も、特に高齢者では、比較的低い。インフルエンザに対する予防接種の効力が比較的低いのは、そのウイルスの抗原変異性が高いことに一部起因している。しかしながら予防接種によるインフルエンザ感染に対する予防は、抗原に対する免疫応答の刺激化および／または改変により改善し得ると信じるに足る理由がある。

#### 【0007】

インフルエンザの場合、もしくは一般的にいうと気道を介して罹る感染症の場合には、予防接種効率を改善するための方法は、血流中の十分なT細胞依存性Ig G応答のみではなく、浸潤してくる感染性ウイルスに対する防御の第一線としての肺および鼻腔内での局所免疫応答（分泌性Ig A）の産生をも目的とすべきである。それに加え、細胞性免疫応答（細胞障害性T細胞）も、特に感染を制限する際には重要であるかも知れない。筋肉内注射（現行の投与経路）を介してのインフルエンザワクチンの投与は気道における局所Ig A応答はもたらさないことが示されている。

#### 【0008】

本発明は、鼻腔内ワクチン製剤内のLTBの存在は、アジュバント無しでの免疫原ワクチンでの筋肉内投与による免疫感作と比較すると血流中のIgG応答を刺激することのみならず、気道内での局所IgA応答も引き起こすという驚くべき発見に関する。

#### 【0009】

未処理の易熱性エンテロトキシン(LT)およびそれに密接に関連するコレラトキシン(CT)は一つのAサブユニット、ならびに5つの同一なBサブユニットからなる一つの5量体環構造からなる。Aサブユニットは酵素活性、すなわちADP-リボシリ化活性を有し、そしてその毒性活性はトキシンに帰属する。腸上皮ではAサブユニットが第二メッセンジャー cAMP の持続合成を誘導し、余剰電解質およびそれに付随する腸内腔への液体分泌をもたらす。

#### 【0010】

LTおよびCTは強力な粘膜免疫原である。局所粘膜投与の際にはこれらの分子は毒素に対する直接的な全身性抗体応答の誘導ばかりでなく、局所的に分泌される抗体の産生をもたらし、その抗体は分泌性IgA(S-IgA)として著名である。LTおよびCTは強力な粘膜免疫アジュバントでもある。すなわち、無関係な他の免疫原と同時投与する際には、LTもしくはCTはその免疫原に対する全身性および粘膜性抗体応答を刺激化しうる。しかしながらLTおよびCTの毒性のため、今日までのところ、ヒトワクチン製剤におけるLTもしくはCTの使用は本質的には妨げられてきた。

#### 【0011】

LTもしくはCTの免疫刺激性活性から毒性を分離する試みでは、毒素の無毒化突然変異体もしくは改変させていないが単離された5量体Bサブユニット(各々、LTBもしくはCTB)がそれぞれの免疫アジュバント活性について調査された。毒素の毒性ADP-リボシリ化活性はAサブユニットに存在するため、明白なことではあるが、ヒトワクチン中に改変していないAサブユニットまたはLTもしくはCTホロトキシンが例え微量でも存在すれば非常に望ましくないことになる。

#### 【0012】

インフルエンザ抗原のためのアジュバントとしてのLTBの使用は Tamura および共同研究者により調査されている (Hirabayashi: Vaccine 8: 243-248 [1990]; Kikutaら: Vaccine 8: 595-599 [1990]; Tamuraら: J. Immunology 3: 981-988 [1992]; Tamuraら: Vaccine 12: 19-426 [1994]; Tamuraら: Vaccine 12: 1083-1089 [1994])。これらの研究では、Davenportら (J. L. lab. & Clin. Med. 63 (1): 5-13 [1964]) に従う Tween /エーテルでの処理によりインフルエンザウイルスから抽出および精製された可溶性インフルエンザウイルス赤血球凝集素 (HA) の使用に基づき、Aサブユニットを含まないLTBは可溶性 HA 抗原と組み合わせてマウスに鼻内投与した際には粘膜免疫アジュバント活性を示さないということが立証された。更には、例えば、ホロトキシンから単離された B サブユニット調製物中に残っている残存ホロトキシンのような微量のホロトキシンの存在が、可溶性 HA 抗原に対する LT B のアジュバント活性の発現を復帰させることも立証された。更に、特に組換え起源からの LT B (そして従って、最小限の微量 A サブユニットさえも完全に含まない) が用いられた場合には、可溶性 HA 抗原と共に鼻腔内に同時に投与される際に LT B に粘膜活性を発揮させるためには微量のホロトキシンを添加する必要があった。

#### 【0013】

驚くべきことに、組換え起源からの、そして従って A サブユニットを完全に含まない単離された LT B は、鼻腔内に同時に投与された免疫原の天然もしくは提示 (presentation) 形態に依存する強力な免疫アジュバント活性を持つことが見いだされた。

#### 【0014】

例えば、オポアルブミン、もしくはヒト免疫不全症ウイルスのエンベロープ糖蛋白質 (gp120) の可溶性エクトドメイン (ectodomain) のような自由に混合された小さな可溶性抗原に対するアジュバント活性は低く、かつ検出不可であることがよくある。他方では、LTBは自由に混合された巨大な凝集

したもしくは粒子状免疫原に対しては非常に強力なアジュバント活性を発揮することが見いだされた。こうした免疫原にはインフルエンザウイルスサブユニット抗原およびカサガイヘモシアニン（K L H）が含まれる。

#### 【0015】

従って本発明は、少なくとも一つの粒子状免疫原、およびAサブユニットもしくは毒性L T ホロトキシンを完全に含まないアジュバント作用性量のL T Bを含んでなるワクチンに関する。

#### 【0016】

本明細書中に定義される際には「粒子状の」は、各々の微生物に特徴的なウイルス、細菌、もしくは真菌類抗原の会合のすべてを意味する。一層特別には用語「粒子状免疫原」は、凝集物、クラスター、ミセル、ヴィロソーム、ロゼット、およびウイルス様免疫原粒子などを含む。

#### 【0017】

本発明に従うワクチンでは特に組換えD N A技術から調製されたL T Bを利用することができる。一つの免疫原もしくは複数の免疫原は例えばウイルスもしくは細菌のような感染性作用物質に由来してよい。

#### 【0018】

先の記述に適用されるワクチンは、粘膜（例えば、鼻腔内）投与の際に免疫原に対して全身性免疫グロブリン（例えば、I g G）を誘導することが見いだされたばかりでなく、I g Aの局所分泌をも誘導することが見いだされた。

#### 【0019】

この後者の特徴は、ウイルス（例えば、インフルエンザウイルス、帶状疱疹ウイルス、パピローマウイルス）、または細菌（クラミジア（C h l a m y d i a）、肺炎球菌のようなもの）、または真菌類での粘膜感染により伝播される疾患に対する免疫化にとっては特に好ましい。

#### 【0020】

粘膜投与に特有の利点はワクチン適用の簡便さであり、それは更には筋肉内免疫化を受ける予防接種被験者に関する注射針恐怖症の可能性を回避させる。

#### 【0021】

例えばインフルエンザ感染の場合では高い血清 Ig G 力価はウイルスの全身性蔓延の予防、および感染に対する肺の保護にとって重要となるものの、局所性 S-Ig A 抗体は上気道の保護のための第一線防御力としては非常に重要なとある。

#### 【0022】

粘膜アジュvantの非存在下での不活化インフルエンザウイルスの鼻腔内投与による粘膜予防接種は成功せず (Clancy : Drugs 50 : 587-594 [1995] ; Katzら : J. Infect. Dis. 175 : 352-369 [1997])、おそらくその理由は粘膜組織に対する抗原の直接投与では S-Ig A 応答がもたらされないためであろうということが報告されている。粘膜アジュvantの同時投与は免疫原に対する局所免疫応答を誘導するための必須条件であるように思われる。顕著なことに、本発明に従う鼻腔内免疫化によりいわゆる一般的粘膜免疫系が活性化され、このことにより適用部位（鼻腔内）のみばかりでなく遠位粘膜組織（例えば、膣粘膜組織）内にも S-Ig A の分泌がもたらされることが見いだされた。

#### 【0023】

本発明に従うワクチンは、例えば細菌性抗原、ウイルスサブユニット（場合によっては不活化されている）、分断 (split) ウイルス（場合によっては不活化されている）、不活化ウイルスもしくは細菌、または弱毒化された（例えば、冷順応させた）生ウイルスのような、例えばウイルス性もしくは細菌性起源の免疫原を粒子状形態で含む。

#### 【0024】

本発明に従って用いられる LTB は毒性 LTA もしくは毒性ホロトキシンを厳密に含まない。LTB が組換えDNA技術により調製されることが好ましい。本文中の「毒性 LTA を含まない」は、完全に LTA を厳密に含まないことを意味する。

#### 【0025】

本発明に従うワクチンでは、LTB を粒子状抗原と自由に混合して使用することができ、その抗原とアジュvantとの間に共有結合 (covalent co

u p l i n g) を確立することができるものの、その共有結合は十分なアジュバント効果を達成するために必要ではない。

#### 【0026】

L T B、または一つもしくは複数の免疫原とは別に、本発明に従うワクチンは水性の溶媒、具体的には緩衝液、更に具体的には P B S (リン酸緩衝生理食塩水)、ならびに安定化剤(例えば、P E G もしくはメチルセルロース)、および／またはグルコースを含んでよい。

#### 【0027】

本発明に従うワクチンの構成成分は凍結乾燥されているか、または液体形態をとってよい。

#### 【0028】

本発明に従うワクチンは、例えばバルクで、またはアンプル内、または注射器内、または噴霧器内に存在してよい。

#### 【0029】

本発明に従うワクチンは、皮下、もしくは筋肉内、もしくは気管支内、もしくは鼻腔内、もしくは腹内適用によるか、または経口的に投与されてよい。

#### 【0030】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

##### 組換え L T B およびインフルエンザサブユニット抗原の調製

##### 組換え L T B

本発明において記載されるところの、組換え L T B 遺伝子および組換え L T B 分子は、例えばブタもしくはヒト起源からの L T - 1 分子をコードする遺伝子に由来してよい。ブタ L T (p L T) 遺伝子は p U C 1 8 ベクター (V i e i r a および M e s s i n g : G e n e 1 9 : 2 5 9 - 2 6 8 [1 9 8 2] ) 内に P C R 技術 (D e H a a n ら : V a c c i n e 1 4 : 2 6 0 - 2 6 6 [1 9 9 6] ) を用いてサブクローニングされた。もどもと Dallas ら (J. B a c t e r i o l. 1 3 9 : 8 5 0 - 8 5 8 [1 9 7 9] ) により記載された E W D 2 9 9 ベクターを P C R 反応における錫型として用いた。この構築物の一次 p L T

配列は、DNA配列決定により確認した際にはEMBL配列データバンクに寄託された際の一次pLT配列に厳密に一致することが見いだされた。pUC18-pLT構築物からpLTB遺伝子を、温度誘導性λPRプロモーター(vander Lindenら: Eur. J. Biochem. 204: 197-202 [1992])を含むpROFIT発現ベクター内にサブクローニングした。

### 【0031】

大腸菌(E. coli) MC1061を、pROFITプラスミド構築物用の宿主株として用いた。細菌は、m1当たり50μgのカナマイシンを含むルリアペルタニ(Luria-Bertani)培地上で増殖させた。pLTB発現の誘導は、De Haanら(上述)により記載されたセ氏28度から42度へとpROFIT-LTBベクターを宿す対数期にあるMC1061培養物の培養温度を上昇させることにより取得した。

### 【0032】

ヒトLTBをコードするpKK由来発現ベクター(Pharmacia LTD.) (すなわち、ヒトでの毒素原性大腸菌である大腸菌(E. coli)細菌から単離されたLT遺伝子に由来するLTB遺伝子)であるpTLTBは、Tamuraおよび共同研究者から取得した。DNA配列決定により、pLTBと比較すると成熟したヒトLTB(hLTB)内での3アミノ酸置換が明らかにされた(Thr4がSerへ、Glu46がAlaへ、そしてLys102がGluへ)。大腸菌(E. coli)株JM101をpTLTBのための宿主として用いた。細菌は、m1当たり100μgのアンピリシンを含むLB培地上で培養した。hLTB発現の誘導は、pTLTBを宿すJM101の対数期培養物に最終濃度が5mMになるまでIPTGを添加することにより取得した。

### 【0033】

pLTBおよびhLTBの精製のためには、過剰発現する細菌を回収し、そしてその後に超音波処理により溶菌した。その後には細胞破片を超遠心分離により除去した。組換えpLTBもしくはhLTBを含む粗精製細胞抽出物をその後に、固定化させたD-ガラクトース(Pierce社)カラムにかけた。徹底的に洗浄した後、精製した組換えpLTBもしくはhLTBを、Uesakaら(M

i c r o b. P a t h. 1 6 : 7 1 - 7 6 [ 1 9 9 4 ] ) により以前に記載される要領での D - ガラクトースでの溶出により取得した。組換え p L T B および h L T B は両方とも以前に記載されるように ( De Haan ら : V a c c i n e 1 4 : 2 6 0 - 2 6 6 [ 1 9 9 6 ] ) GM 1 捕獲用 E L I S A 内では至適 GM 1 - 結合性特性を保持していることが見いだされた。精製された蛋白質を含むカラム分画を合わせ、 P B S に対して透析し、そして 4 ℃ に保存した。

#### インフルエンザサブユニット抗原

インフルエンザサブユニット抗原は、 Bachmayer ら ( 1 9 7 8 年 1 月 1 8 日の英国特許明細書第 1 4 9 8 2 6 1 号) および Chaloupka ら ( Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 1 5 : 1 2 1 - 1 2 7 [ 1 9 9 6 ] ) により記載される方法に従い、 ふ化鶏卵上で増殖させた B / Harbin / 7 / 9 4 ウィルス ( B / Harbin ) もしくは A / Johannesberg / 3 3 / 9 4 ( A / Johannesberg ) から調製した。この方法は、 ホルムアルデヒドにより不活化させたウィルスの適當なカチオン性界面活性剤での処理、 放出された抗原 ( 赤血球凝集素およびノイラミニダーゼ ) のウイルスの残存コアからの分離の段階を含む。この方法により、 界面活性剤の除去の後の抗原の粒子状すなわちミセル様露出状態 ( e x p o s i t i o n ) がもたらされる。

#### 【 0 0 3 4 】

m l当たりの  $\mu$  g として表現されるサブユニット抗原調製物の効力を、 Wood ら ( J. Biol. Stand. 5 : 2 3 7 - 2 4 1 [ 1 9 7 7 ] ) に従う単純放射状拡散試験で決定した。

#### 【 0 0 3 5 】

##### 実施例 2

###### インフルエンザサブユニットワクチンに対する全身性抗体応答

4 匹のマウスからなる群を、 麻酔無しで、 実施例 1 に記載される方法に従い調製された B / Harbin もしくは A / Johannesberg のいずれかに由来する 5  $\mu$  g のインフルエンザサブユニット抗原で鼻腔内免疫化した。抗原は、 単独 ( HA ) もしくは 2. 0  $\mu$  g の p L T B ( p L T B ) と一緒に状態のいず

れかで、全ての場合において $20\mu l$ の容量で、0、7、および14日目に投与した。対照マウスには同一容量のPBSを投与した。マウスを28日目に屠殺した。血清IgG抗体応答を直接ELISAで決定した。

#### 【0036】

図1は、HA-B/Harbin(黒塗り棒)およびA/Johannesberg(白抜き棒)に対して観察された血清IgG抗体応答を示す。

#### 【0037】

アジュバント無しでのサブユニット抗原の経鼻投与では全身性抗体応答は殆ど生じなかつたが、サブユニット抗原をpLTBで補足すると2桁を上回る強度で血清抗体応答が亢進した。B/HarbinおよびA/Johannesbergで免疫化したマウスの応答間の違いは有意ではなかつた。

#### 【0038】

これらの結果により、無毒性pLTBは鼻腔内投与されたインフルエンザサブユニット抗原に対する高い全身性抗体応答を誘導することができる強力なアジュバントであることが示される。

#### 【0039】

##### 実施例3

##### ヒトおよびブタLTBでの全身性抗体応答の比較

4匹のマウスからなる群を、麻酔無しで、実施例1に記載される方法に従い調製されたB/Harbinインフルエンザウイルスに由来する $5\mu g$ のインフルエンザサブユニット抗原で鼻腔内免疫化した。

#### 【0040】

抗原は、単独(NONE)、または $2.0\mu g$ のpLTB(pLTB)もしくは $2.0\mu g$ のhLTB(hLTB)と一緒に状態のいずれかで、全ての場合において $20\mu l$ の容量で、0、7、および14日目に投与した。対照マウスにはPBSを投与した。マウスを21日目に屠殺した。血清IgG抗体応答を21日に直接ELISAで決定した。

#### 【0041】

図2は、HA-B/Harbinに対して観察された血清IgG抗原応答を示

す。

#### 【0042】

アジュバント無しでのサブユニット抗原の経鼻投与では再度、全身性抗体応答は殆ど生じなかったが、サブユニット抗原を p L T B および h L T B で補足すると 2 桁を上回る同程度の強度で血清抗体応答が亢進した。p L T B および h L T B で処理した動物の間に観察された違いは有意ではなかった。

#### 【0043】

##### 実施例 4

###### インフルエンザサブユニットワクチンへの局所粘膜抗体応答の誘導

p L T B がインフルエンザ H A - 特異的 S - I g A 応答を誘導する能力を調査する目的で、実施例 2 からのマウスの鼻内洗浄液を、インフルエンザ特異的 I g A 抗体の存在について分析した。鼻内洗浄液は、0.5 ml の P B S を鼻咽頭を介して気管の上部へ逆方向に勢いよく洗浄し、逆流させて洗浄し、そして鼻孔で洗浄液を回収することにより取得した。

#### 【0044】

結果を図 3 に示す。

#### 【0045】

このデータにより、組換え p L T B は H A に対する強力な局所 S - I g A 応答を誘導したことが示された。2 つの異なるインフルエンザサブユニット抗原は類似の結果をもたらした。

#### 【0046】

##### 実施例 5

###### ヒトおよびブタ L T B での粘膜抗体応答の比較

鼻内 H A - 特異的抗体応答を亢進させる p L T B および h L T B の能力を比較する目的で、実施例 3 からのマウスの鼻内洗浄液を先に記載される要領で回収し、そして 21 日目に H A - 特異的 S - I g A の存在について分析した。図 4 は、p L T B および h L T B の両方が活発な鼻内 H A - 特異的抗体応答を誘導することを示す。その上、p L T B および h L T B で得られた応答の強度は同等であり、このことにより両方の分子は同等なアジュバント特性を有することが示された

## 【0047】

## 実施例6

鼻腔内適用されるインフルエンザサブユニットワクチンに対する一般的粘膜抗体応答の誘導

投与部位以外の粘膜部位でのインフルエンザHA—特異的S—IgA応答を誘導する組換えpLTBの能力を調査する目的で、実施例2からのマウス内での鼻腔内免疫化の後の生殖管内でのインフルエンザ特異的S—IgA抗体の誘導を調査した。尿生殖路の洗浄は、ピペットチップを用いて腔内への100μl容量のPBSの10回の導入および回収により実施した。粘膜洗浄液はELISAによるIgA含有量の決定までは4℃に保存した。この結果を図5に示す。

## 【0048】

この結果により、pLTBはこの遠位の粘膜部位でS—IgA応答を誘導するのに有効であると判明したことを示す。B/HarbinおよびA/Johannesburg抗原の両方は同じくらいよく応答した。

## 【0049】

## 実施例7

## IgG応答の動力学

8匹のメスBALB/cマウス（6～8週令）からなる4群各々を以下のように処置した。

対照 抗原無しの状態でPBSで処理した。麻酔無しの状態で20μlを0、7、および14日目に鼻腔内投与した

pLTB 麻酔無しの状態で、0、7、および14日に5μgのHAおよび2.0μgの組換えpLTBを20μlで鼻腔内適用した

HA s.c. 麻酔無しの状態で、0日目に5μgのHAを100μlで皮下適用した

Conv. 回復期のマウス、すなわち麻酔無しの状態で0日目にPR8ウイルスの10<sup>3</sup>感染単位を20μlで鼻腔内適用した

各群の4匹のマウスから血液試料を、6、13、および20日目に尾静脈から

採取した。その上、28日目には全てのマウスを屠殺および脱血した。各試料中の血清 Ig G を E L I S A により測定した。

### 【0050】

結果を図6に示す。各々のワクチン療法についての棒（左から右へ）はそれぞれ6、13、20、および28日目の Ig G 力値を示す。これらの結果は HA / p L T B と共に鼻腔内予防接種の後には Ig G 誘導は、HA 単独での皮下予防接種の後、もしくは回復期のマウスにおけるものと少なくとも同一強度のものとなることを示す。

### 【0051】

#### 実施例8

##### 鼻および肺の粘膜抗体

実施例7で調査されたものと同一のマウスに、先に記載される要領で28日目に屠殺した後に鼻腔および尿生殖路の粘膜洗浄を施した。

### 【0052】

結果は図8にまとめてある。斜線の付された棒は鼻内洗浄液からのデータを示し、そして白抜き棒は膣洗浄液からのデータを示す。

### 【0053】

この結果により、HA / p L T B による鼻腔内予防接種の際の第一線の防御抗体 (S-IgA) の力値は回復期にあるマウスにおける S-IgA 力値と少なくとも同一程度のものである一方で、HA による（古典的）皮下予防接種は検出可能な粘膜 Ig A 力値をもたらさない。

### 【0054】

#### 実施例9

##### 予防接種を施したマウスの攻撃感染抗原投与に対する防御

実施例7の各群の4匹のマウスを28日に麻酔無しの状態で、 $20 \mu l$  中に含まれる  $5 \times 10^6$  の感染単位の PR8ウイルスで鼻腔内経路で感染させた。

### 【0055】

攻撃誘発後3日目に鼻および肺のウイルス負荷を決定した。

### 【0056】

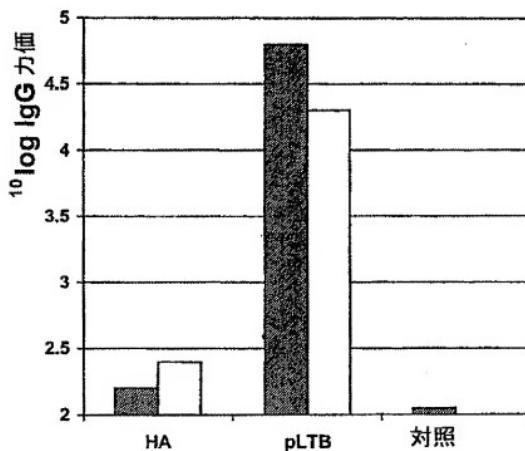
鼻および肺のホモジネート中のウイルス力価測定は、2段階稀釀およびその後のモルモット赤血球と赤血球凝集素を用いる終点決定によりマイクロタイトレーションプレート内でのEPI SERF (Life Technologies社、PAISLY、Scotland) 上で培養したMDCK細胞上で実施した。

### 【0057】

結果を図7にまとめてある。斜線の付された棒は鼻でのウイルス力価を示し、そして白抜き棒は肺についてのものである。回復期にあるマウスおよびpLTBと共に実施する予防接種の際の肺でのウイルス力価は有意ではなかった。従ってこれらのデータは、pLTBを粘膜アジュバントとして用いることによりインフルエンザ感染に対する防御が完全であることを示す。

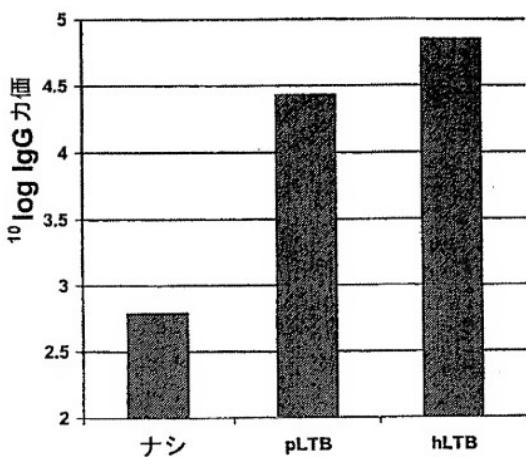
### 【図1】

FIGURE 1



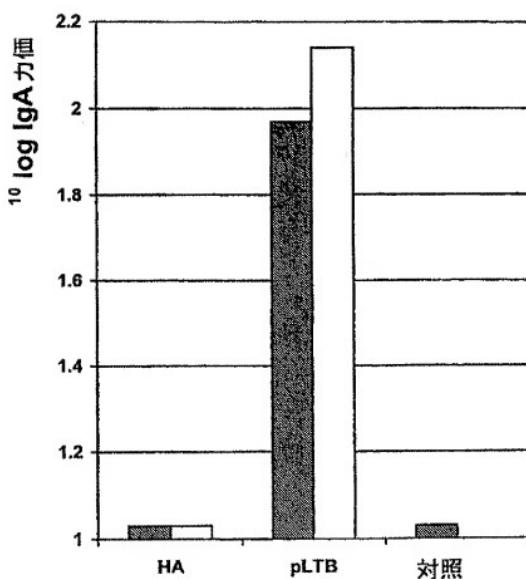
【図2】

FIGURE 2



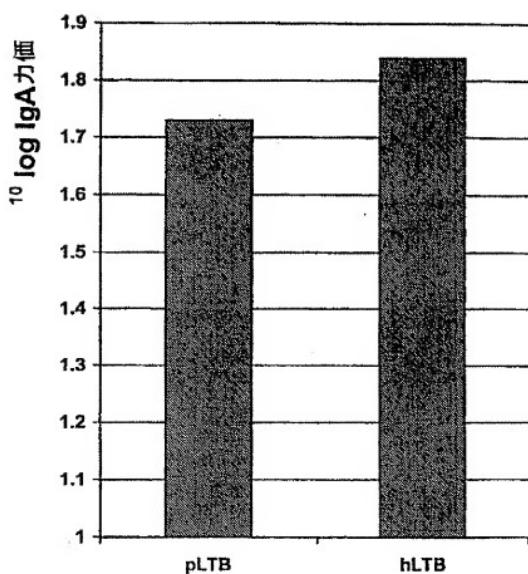
【図3】

FIGURE 3



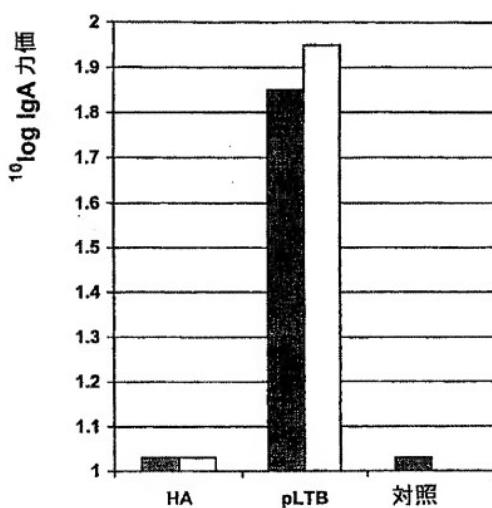
【図4】

FIGURE 4



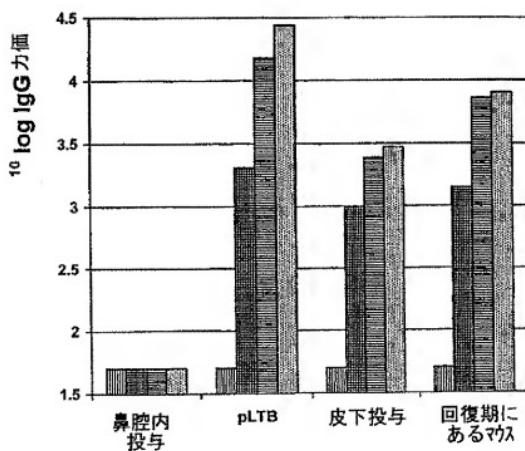
【図5】

FIGURE 5



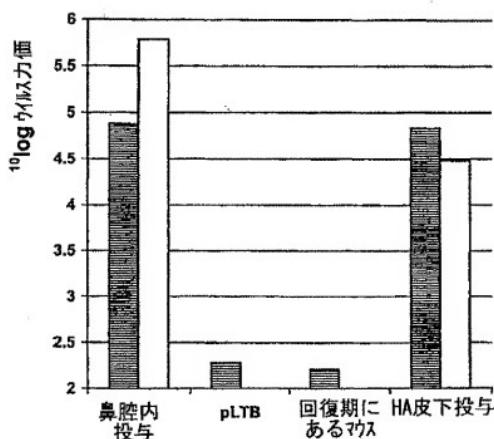
【図6】

FIGURE 6



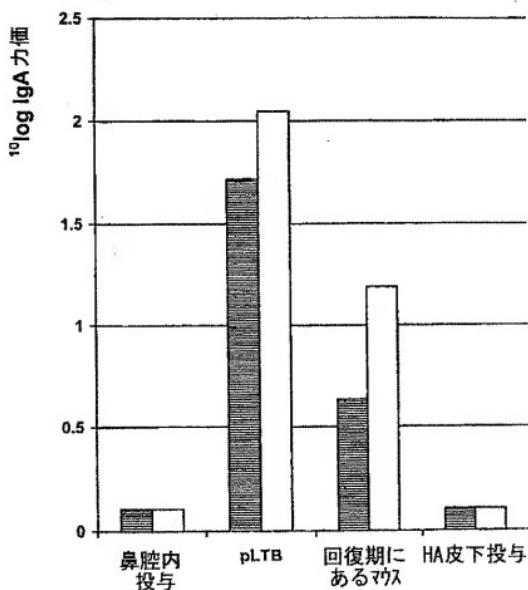
【図7】

FIGURE 7



【図8】

FIGURE 8



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成11年9月30日(1999.9.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Aサブユニットもしくは毒性LTホロトキシンを全く含まず、少なくとも一つの粒子性免疫原および大腸菌(E. coli)に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット(LTB)のアジュバント作用性量を含む粘膜投与用のワクチン。

【請求項2】 LTBが組換えDNA法により調製される、請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】 ウィルスもしくは細菌もしくは真菌類の抗原が免疫原として用いられる、請求項1～2に記載のワクチン。

【請求項4】 免疫原が、粘膜感染により伝播する疾患に対する免疫感作を提供する、請求項1～3に記載のワクチン。

【請求項5】 インフルエンザ抗原が免疫原として用いられる、請求項4に記載のワクチン。

【請求項6】 ある免疫原に対する全身性免疫グロブリン応答の誘導方法であって、Aサブユニットもしくは毒性LTホロトキシンを全く含まず、粒子形態をとる前記免疫原および大腸菌(E. coli)に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット(LTB)のアジュバント作用性量を粘膜投与する方法。

【請求項7】 ある免疫原に対する一般的粘膜免疫応答の誘導方法であって、Aサブユニットもしくは毒性LTホロトキシンを全く含まず、粒子形態をとる前記免疫原および大腸菌(E. coli)に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット(LTB)のアジュバント作用性量を粘膜投与する方法。

【請求項8】 Aサブユニットもしくは毒性LTホロトキシンを全く含まず、

大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット（LT B）の、粒子状免疫原、および粘膜投与の際の個体内での前記免疫原に対する全身性免疫グロブリン応答の誘導に適する前記LT Bのアジュバント作用性量を含むワクチン調製物での使用。

【請求項9】 Aサブユニットもしくは毒性LTホロトキシンを全く含まず  
大腸菌（E. coli）に特徴的な易熱性エンテロトキシンのBサブユニット（LT B）の、粒子状免疫原、および粘膜投与の際の個体内での前記免疫原に対する一般的粘膜免疫応答の誘導に適する前記LT Bのアジュバント作用性量を含むワクチン調製物での使用。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 98/07553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/39 // A61K39:145		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) [IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE HAAN, LOLKE ET AL: "Mucosal immunogenicity of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin: role of the A subunit" VACCINE (1996), 14(4), 260-266 CODEN: VACCD; ISSN: 0264-410X, XP004057320 see the whole document ---	1-10
A	HASHIGUCCI, KAZUHIRO ET AL: "Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin" VACCINE (1996), 14(2), 113-119 CODEN: VACCD; ISSN: 0264-410X, XP004057352 see the whole document ---	1-10 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
*E* earlier document published on or after the international filing date		
*L* document which may throw doubts on priority (disturb) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
*O* document relating to an oral disclosure, test, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step without having regard to the document		
*V* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step even if the document is relied upon to provide means well known for solving the problem in question		
*A* document member of the same patent family		
Date of the earliest compilation of the international search  21 April 1999	Date of mailing of the international search report  07.05.99	
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.O. Box 3516 Patenttaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-5040, Fax: 31-851 096 n. E-mail: (31-70) 340-5016	Authorized officer  Mennessier, T	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 98/07553

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANURA, SHIN-ICHI ET AL: "Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine" VACCINE (1994), 12(12), 1083-9 CODEN: VACCD; ISSN: 0264-410X, XP002100633 cited in the application see the whole document -----	1-10
A	NASHAR T O ET AL: "Current progress in the development of the B subunits of cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin as carriers for the oral delivery of heterologous antigens and epitopes." VACCINE, (1993) 11 (2) 235-40. REF: 49 JOURNAL CODE: X60. ISSN: 0264-410X., XP000645274 ENGLAND: United Kingdom see the whole document -----	1-10
T	VERWEIJ, WILLEM R. ET AL: "Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen" VACCINE [DECEMBER 1998], 16(20), 2069-2076 CODEN: VACCD; ISSN: 0264-410X, XP004138458 see the whole document -----	1-10

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP 98/07553
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  <b>Although claims 7-8 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the vaccine composition.</b></p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>		
<p><b>Remark on Protest</b></p>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国 E P (A T, B E, C H, C Y,  
 D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I  
 T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J  
 , C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L,  
 M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K  
 E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M  
 , A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M)  
 , A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G,  
 B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D  
 K, E E, E S, F I, G B, G D, G E, G H, G M  
 , H R, H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G,  
 K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L  
 U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O  
 , N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G,  
 S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U  
 G, U S, U Z, V N, Y U, Z W

(72)発明者 アグステリツベ、エティエンヌ

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

(72)発明者 ブランズ、ルディ

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

(72)発明者 デ・ハーン、ロルケ

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

(72)発明者 パン・シャレンブルグ、グスターフ・ヨハ  
 ン・マリー

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

(72)発明者 ベルウェイイ、ウイレム・ロナルド

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

(72)発明者 ウイルシユト、ヤン・クリスティアーン

オランダ・エヌエル-1381シーピー ウエ  
 ースブ・シージエイバンホウテンラーン  
 36・デュファー・インターナショナル・リ  
 サーチ・ペー・ブイ

Fターム(参考) 4CD85 AA03 AA38 BA07 BA49 BA51  
BA55 BA57 CC07 CC08 DD62  
EE01 FF19 GG10  
4H045 AA11 AA30 CA01 CA11 DA83  
DA86 EA31 FA74